气肿疽梭菌(CC)核酸扩增检测试剂盒说明书(PCR-荧光探针法)

【名 称】

中文名：气肿疽梭菌(CC)核酸扩增检测试剂盒

英文名：Clostridium Chauvoei Polymerase Chain Reaction (PCR) Diagnostic Kit

汉语拼音: qi zhong ju suo jun he suan kuo zeng jian ce shi ji he

【目的】本试剂盒适用于检测疑似病牛血液、肌肉肿胀部分泌物液体或组织及淋巴结等组织和环境中疑似污染土壤、饲料及水标本气肿疽梭菌(CC)DNA，适用于气肿疽梭菌(CC)感染引起的黑腿病的辅助诊断及流行病学调查。其检测结果仅供参考。

【原理】本试剂盒选取一对气肿疽梭菌(CC)特异性引物和一条特异性荧光探针，通过碱裂解法提取气肿疽梭菌(CC)DNA，后者在耐热 DNA 聚合酶(Taq 酶)作用下，配以 FQ-Buffer(内含 Mg^{2+}、Tris-HCl 等)、四种核苷酸单体(dNTPs)等成分，通过 PCR-荧光探针体外扩增法对气肿疽梭菌(CC)进行扩增，从而达到实时快速定量检测之目的。

【组成】

名　　称	数　　量	规　　格
核酸提取液 B	4　管	500μl/管
Taq 酶系	1　管	80μl/管
CC PCR MIX	1　管	960μl/管
CC 阳性质控品	1　管	50μl/管(1×10^7Copies/ml)
阴性质控品	1　管	500μl/管

备注：10×RCLB 另行配备。

【标本采集、保存和运输】

1. 适用标本类型：疑似病牛血液、肌肉肿胀部分泌物液体或组织及淋巴结等组织和环境中疑似污染土壤、饲料及水标本。

2. 标本采集

全血：无菌条件下用注射器取人或动物静脉血 2-3ml，转至一含有枸橼酸钠或 Na_2EDTA 的抗凝管中，轻轻颠倒数次混匀，立即送检。

肌肉肿胀部分泌物液体：无菌条件下切开肿胀部，注射器吸取液体分泌物 2-3ml，转至一 5ml 离心管中，密闭送检。

肌肉、淋巴结等组织：无菌条件下取疑似动物肌肉、淋巴结 1g，转至一洁净的 1.5ml 离心管中，密闭送检。

疑似污染土壤、饲料及水标本：无菌条件下取上述标本 1g 或 1ml，转至一含有 2ml 生理盐水的 5ml 离心管中，密闭送检。

3、保存和运输：上述标本短期内可保存于-20℃，长期保存可置-70℃。但不能超过 6 个月，标本运送应采用 0℃冰壶。

【适用仪器】主要包括 ABI GeneAmp PCR System7700、ABI GeneAmp PCR System7500、ABI PRISM 7300、LightCycler 等毛细管的仪器，MJ Opticon 系列或取得资格认证的定量 PCR 仪。

【诊断标准】本试剂盒符合中华人民共和国国家标准《牛气肿疽“黑腿病”防治技术》诊断标准。按照国标方法进行增菌可提高检出率。

【贮藏、规格及有效期】40 份/盒。-20℃避光保存，避免反复冻融。有效期 12 个月。

【使用方法】

1. DNA 提取

1.1 标本预处理

1.1.1 外周血淋巴细胞分离 (用户亦可用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞)

1.1.1.1 将抗凝血摇匀，取 500μl 转至一洁净的 1.5ml 离心管中，编号标记。

1.1.1.2 加入 1ml 1×红细胞裂解液(**RCLB,试剂盒配备 10×RCLB，使用前请用双蒸馏水按 1：9 比例配制成 1×RCLB**)，剧烈震荡 30s，3,000g 离心 5min，弃上清。

1.1.3 重复 1.2 两至三次至无明显红色沉淀。(若沉淀明显，请再重复步骤 1.2 一次)。

1.1.3.4 加入 1ml 生理盐水，剧烈震荡 15s，10000g 离心 5min，弃上清。

1.1.2 肌肉、淋巴结等固体组织：取适量(500mg)固体组织，用生理盐水洗净表面残余血液，转至研磨器中，加 1ml 生理盐水，研磨成组织匀浆，取 50μl 组织匀浆转至 1.5ml 洁净的离心管中。

1.1.3 肌肉肿胀部分泌物液体、疑似污染土壤、饲料及水标本：充分混匀上述标本，取 1ml 液体标本转至一洁净的 1.5ml 离心管中，13,000g 离心 1min，弃上清，沉淀加 1ml 生理盐水，充分混匀，13,000g 离心 1min，弃上清。

1.2 DNA 提取：向上述标本中加 50μl ***核酸提取液 B***（内含不溶物质，用前需室温溶解并充分混匀），充分混匀，100℃裂解 10min，4℃13,000g 离心 3min，取上清液 4μl 做 PCR 扩增。

阴性质控品：取 ***50μl 阴性质控品***，加 50μl ***核酸提取液 B*** 充分混匀(提取液用前需室温溶解并充分混匀)后 100℃10 分钟，13,000rpm 离心 3 分钟，取上清液 4μl 做 PCR 反应。

CC 阳性质控品：直接取 4μl 进行 PCR 扩增，或按照 PCR 扩增介绍方法进行定量分析。

2．PCR 扩增

从试剂盒中取出 ***CC PCR MIX***、***Taq 酶系***，室温融化并振荡混匀后，10,000rpm 离心 10s。

设所需要的 PCR 反应管管数为 N（N=样本数+1 管阴性对照+4 管阳性对照），每个测试反应体系配制如下表：

试剂	***CC-PCR MIX***	***Taq 酶系***
用量	24μl	2μl

计算好各试剂的使用量，加入一适当体积洁净离心管中，充分混匀，10,000rpm离心 10s，向设定的N个PCR反应管中分别加入 26μl，向每管中加入处理后样品(所获得的RNA样品)或***CC-阳性定量标准品(使用前用阴性质控品梯度稀释阳性质控品 10 倍、100 倍、1000 倍，记为 1×10^6 Copies/ml，1×10^5 Copies/ml，1×10^4 Copies/ml)***和***阴性质控品*** 4μl，10,000rpm瞬时离心 30 秒。将各反应管放入定量PCR仪器的反应槽内，按对应顺序设置***阴性控品，阳性定量标准品***以及未知标本，并设置反应体积(30μl)、样品名称、标记荧光基团种类(报告基团为FAM，淬灭基团为TAMRA)和循环条件：

ABI PRISM 7700，ABI PRISM5700，ABI GeneAmp 7000 (需要剪掉反应盖)，ABI PRISM7300/7500(使用 8 联管)，MJ Opticon(使用 8 联管)等使用薄壁管的仪器，循环条件：94℃→2 分钟变性，后 93℃ 30 秒→55℃ 45 秒，40 个循环。

LightCycler 等使用毛细管的仪器, 循环条件：94℃→2 分钟变性，后 93℃ 5 秒→58℃ 45 秒，共 40 个循环。

3．结果分析判定

反应结束后保存检测数据文件。根据分析后图像调节 baseline 的 start 值（3~8），stop 值（13~18）以及 Threshold 值，使 Std curve 窗口下的标准曲线达到最佳（correlation 数值介于-0.97~-1 之间，correlation 数值等同于｜r｜值），最后到 Reporter 窗口下记录仪器自动分析计算出的未知标本数值（Qty-Copies/ml）。

【质控标准】

阴性质控品：全部阴性。

CC 阳性质控品：***阳性质控品***的 Ct 值均应小于 35.0。

｜r｜≥0.97（correlation 数值介于-0.97~-1 之间，correlation 数值等同于｜r｜值）。

以上条件应同时满足 ，否则，此次试验视为无效，全部试验应重新进行。

【结果判定】

测定结果的计算：

如果 Ct 值 < 38，则实验样品的 CC DNA 含量(基因拷贝数/ml)= Qty-Copies/ml；

如果 38 < Ct 值 < 40，为灰区建议重新检测，重新检测若 38 < Ct 值 < 40 判为阳性，否则为阴性。

如果Ct值=40，则CC DNA含量（基因拷贝数/ml） < 1×10^2Copies/ml (低于检测下限)。

【注意事项】

使用前请仔细阅读说明书。并且严格按照说明书进行操作。

试剂盒内各种组分使用前应充分融化混匀并经高速短暂离心后试用。每盒试剂请于 3 次内使用完毕。

试剂盒须避光保存，以免荧光物质衰减。所有使用的离心管、 Tip 头应高压灭菌，而且必须不含 DNase 。

PCR 操作应严格按照要求分区(试剂配制区、标本处理区、PCR 扩增区等)，防止实验室污染。

试剂盒里所有物品应视为污染物对待，并按照《微生物生物医学实验室生物安全通则》进行处理。

【生产企业】 公司名称：北京索奥生物医药科技有限公司

公司地址：北京中关村丰台科技园航丰路 8 号

邮政编码：100070 电话：010-58051371 传真：010-58051378

免费电话：800-990-3566

生产地址：中关村丰台园生命科学孵化中心

公司网址：http://www.suoaobio.com

电子邮箱：Order@suoaobio.com